

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価
及びリスク低減化に関する研究

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

研究分担者	河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部	室長
研究協力者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	室長
研究協力者	小森谷 薫	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	
研究協力者	比留間 瞳	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	
研究協力者	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	主任研究官

本研究では、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度のナノマテリアル懸濁液を用いて、細胞毒性に対する一次粒子径の影響を評価することを目的としている。試験に供試しているナノマテリアルの一次粒子径については、これまでメーカーからの情報で NiO-Sigma が 50 nm 未満、Ni-Alfa が 5 ~ 20 nm としてきたが、より詳細な一次粒子サイズの把握が必要と考え、TEM による観察を行った。その結果、NiO-Sigma では数 nm 程度の大きさの粒子と 10 ~ 50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在して存在していた。これら大きさの異なる 2 群について、元素組成を STEM-EDS にて測定した結果、どちらの群の粒子もニッケル及び酸素の存在割合が同程度 (1:1) となり、全て NiO であることが確認できた。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、全て一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の細胞毒性試験を実施したところ、ばらつきが大きい Ni-Alfa の方が若干、細胞毒性が強い傾向を示し、二次粒子径が同程度の場合には一次粒子径が小さいほど毒性が強くなる可能性が示唆された。この要因として、二次粒子径が同程度であれば、一次粒子径が小さいほど一つの二次粒子を構成している一次粒子の数は多くなり、表面積も大きくなる。そのため、細胞内に取り込まれるナノマテリアルの一次粒子の数が多くなったり、細胞との接触面積や溶出する Ni イオン量が多くなったりし、結果として細胞毒性に違いが生じたものと考えられた。今後は Ni イオン溶出量の測定や細胞内の粒子濃度の測定などが必要と考えられた。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と一般的に定義される¹⁾。そして、これまでに種々のナノマテリアルが開発され、工業製品、塗料、化粧品、触媒など様々な分野の製品に使用されてきた。

一方で、ナノマテリアルまたはナノマテリアルを用いた製品の製造時に、作業員がナノマテリアルに曝露される可能性や、製品中に含有されるナノマテリアルに消費者が曝露され、ナノマテリアルに特有の毒性の発現が懸念されている^{2,3)}。

このような背景から、様々な *in vivo* ならびに *in vitro* 試験系において、ナノマテリアルの安全性が研究され、一部のナノマテリアルについては、化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されている⁴⁾。しかし、これまでに行われてきたナノマテリアルの生体影響に関する研究について、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションが不十分なために、研究者の経験則に基づいた試験が行われ、異なる実験室間で得られた結果を比較することが難しい事が指摘されている⁵⁾。そして、ナノマテリアルの安全性評価については、試験法や評価基準などが明確でなく断片的な試験結果の集積に留まっているとして、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が必要とされている⁶⁾。このような背景から、欧州委員会の共同研究センターではコロニー形成試験法によるナノマテリアルの細胞毒性試験について多機関共同試験による評価が実施されており、ナノマテリアルの統一的な毒性試験方法の検討が進んでいる⁷⁾。

金属酸化物ナノマテリアルは工業材料や消費生活製品材料として開発されており、ZnO、SiO₂ 及び TiO₂ 等は化粧品や塗料等に用いられている⁶⁾。これら金属酸化物ナノマテリアルに関して、様々な *in vitro* 試験が行われている。例えば、Yuan らは一次粒子径サイズの異なる SiO₂ ナノ粒子による細胞毒性試験を行い、一次粒子径の違いが細胞毒性に影響を及ぼすことを明らかにしている⁸⁾。また、*in vivo* 試験では、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる TiO₂ ナノ粒子によるラット気管内投与試験で、二次粒子径サイズが異なっても炎症反応に差異は認められないことが報告されている⁹⁾。

このように、個々の金属酸化物ナノマテリアルの物性が毒性試験の結果に影響を及ぼすことから、毒性試験にはその物性情報

として、状態（粒子径・粒径分布・凝集体・形状）、材料（化学組成・結晶性・表面組成・純度）、周囲に影響する因子（表面積・表面化学特性・表面荷電）の3点に加え、安定性、培地の影響及び適切な用量計測での評価が求められている⁵⁾。

我々はこれまでに、金属酸化物ナノマテリアルの培養細胞試験系における細胞応答に及ぼすナノマテリアルの影響の解明を目的として、培養細胞試験系に用いる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製方法の検討とその物性解析を行ってきた¹⁰⁾。そして、NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型粉碎機の粉碎ボール径を変えることで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製法を開発した。さらに、それらの懸濁液について A549 細胞（ヒト肺基底上皮腺癌由来細胞）を用いた細胞毒性試験を実施し、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなることや、その要因が NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量に起因する可能性を明らかにしてきた。

一方で、前述のように金属酸化物ナノマテリアルの細胞毒性に一次粒子径サイズが影響していることが報告されている⁸⁾。そこで、本研究では NiO ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性について、一次粒子径サイズの影響を評価することを目的とした。昨年度は、一次粒子径が異なり二次粒子径サイズが同程度の NiO ナノマテリアル懸濁液の調製を検討した。2種類の NiO ナノマテリアル及び表面が酸化被膜でおおわれている Ni ナノマテリアルの3種類について検討し、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の2種類について、濃度 1 mg/mL で懸濁原液の調製が可能であることを見出した。本年度は、電子顕微鏡観察による一次粒子径及び形状の確認と、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験を実施した。

B. 研究方法

B.1 ナノマテリアル

試験には Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma) 並びに Alfa Aesar 製の NiO 及びニッケルナノマテリアル (NiO-Alfa 及び Ni-Alfa) を用いた。それらの性状等を表 1 に示した。Ni-Alfa については、メーカーのデータシートによれば、表面から深さ 0.5 ~ 1.0 nm まで酸化被膜に覆われているとされており、昨年度に酸化皮膜の存在を確認し、NiO と同等に扱えるものと考えた¹¹⁾。これらのナノマテリアルの一次粒子径は、NiO-Sigma (<50 nm) 及び Ni-Alfa (5 ~ 20 nm) であった。

B.2 電子顕微鏡観察によるナノマテリアルの一次粒子径及び形状観察

各ナノマテリアルをエタノールに懸濁させ超音波処理した後、マイクログリッド (コロジオン膜) 上に滴下して乾燥させ、透過型電子顕微鏡 (TEM) にて粒子径及び形状観察を行った。用いた TEM は日立ハイテクノロジーズ製 H-9500 で加速電圧は 200 kV とした。また、各ナノマテリアルの元素組成について、日立ハイテクノロジーズ製 HD2300A を用いた、走査型透過電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法 (STEM-EDS) により測定した。これらの分析は東芝アナリティクス株式会社にて実施した。

B.3 ナノマテリアル懸濁源液の調製

これまでに我々が開発した、遊星ボールミル型湿式ナノ粉砕機を用いた方法に従い懸濁液の調製を行った。粉砕機は NP-100 (シンキー製) を用い、粉砕容器はジルコニア製であった。粉砕には、直径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の三種類のジルコニアボールを用いた。始めに、金属酸化物ナノマテリアル試料 10 mg をジルコニア容器に量り採り、そこに Tween80 を 0.1% (w/v) 含

む Milli-Q 水を 2.5 mL 加えた。次に、ジルコニアボールを 2.5 g 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 2000 rpm の条件で 2 分間粉砕を行った。その後、Milli-Q 水を 7.5 mL 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 400 rpm の条件で 1 分間混合し、懸濁原液 (1 mg/mL) を作製した。また、そのナノマテリアル懸濁液を 10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO) を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO) (以降: 10%FBS-MEM) を用いて希釈し、培地懸濁液を作製した。

これらの懸濁液について、大塚電子社製の ELSZ-2 を用い、ナノマテリアルの平均粒子径 (流体力学粒径) 及び粒径分布を動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) で、Zeta 電位は電気泳動光散乱法 (レーザードップラー法) にて測定した。その際、平均粒子径は Cumulant 法で、粒径分布は Marquardt 解析法を用いたヒストグラム法でそれぞれ求めた。平均粒子径及び粒径分布については同一試料を繰り返し 3 回測定した。Zeta 電位については、平均粒子径を測定した後に同一試料を繰り返し 4 回測定して求めた。

B.4 細胞毒性試験

細胞毒性試験には A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞: JCRB 細胞バンク) を用いた。細胞は 10%FBS-MEM を用いて、37 °C、5%CO₂ インキュベーターで培養したものをを用いた。試験液には、各ナノマテリアル懸濁原液を前述の液体培地で希釈したものをを用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後に試験培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 μ L の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 μ L の Cell Titer 96[®] Aqueous

One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO₂ インキュベーターで 37 ℃、1 時間反応させた。その後、生成したフォルマザンをマイクロプレートリーダーにて測定 (波長 440 nm) した。そして、培地のみで細胞を培養した well を対照として、細胞生存率を算出した。試験は 1 回に n=3 で実施し、それを 3 回行って平均値化した。

C. 結果及び考察

C.1 電子顕微鏡観察によるナノマテリアルの一次粒子径及び形状観察

メーカーのカタログでは、実験に供試している各ナノマテリアルの一次粒子径は NiO-Sigma が 50 nm 未満、Ni-Alfa が 5 ~ 20 nm と記載されている。本研究では、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度のナノマテリアル懸濁液の毒性評価を目的としており、より詳細な一次粒子サイズの把握が必要と考え、TEM による観察を行った。

NiO-Sigma の TEM 画像を図 1 に示した。数 nm 程度の大きさの粒子と 10 ~ 50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在して存在していた。また、粒子カウントによる平均粒子径測定を試みたが、粒子の凝集度合いが強いこと、粒子の輪郭部がはっきりしないことなどから断念した。大きさの異なる 2 群について、元素組成を STEM-EDS にて測定した結果を図 2 に示した。その結果、どちらの群の粒子もニッケル及び酸素の存在割合が同程度 (1:1) となり、どちらの粒子も NiO であることが確認できた。

Ni-Alfa の TEM 画像を図 3 に示した。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。ただし、粒子カウントによる平均粒子径測定については、NiO-Sigma と同様に粒子の凝集度合いが強いこと、粒子の輪郭部

がはっきりしないことなどから断念した。

C.2 各ナノマテリアルの細胞毒性

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験結果について図 4 に示した。また、各懸濁液中のナノマテリアルの物性に関しては表 2 に示した。

NiO-Sigma の各試料の半数致死濃度 (IC₅₀) は、調製に用いたジルコニアボール径 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 23.1、29.3 及び 39.0 µg/mL であった。NiO-Sigma については、ジルコニアボール径が 0.1 mm 及び 0.05 mm の試料では差が認められず、0.5 mm の試料では他に比べてやや細胞毒性が強くなる傾向を示した。

Ni-Alfa に関しては、各試料の IC₅₀ は調製に用いたジルコニアボール径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 18.9、24.0 及び 32.6 µg/mL であった。Ni-Alfa については、各濃度でのデータのばらつきが大きく、二次粒子径サイズが細胞毒性に及ぼす影響については評価できなかった。

昨年度、径が 0.05 mm のジルコニアボールを用いることで、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた¹¹⁾。そこで、同一条件で調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験結果を図 5 に示した。ばらつきが大きいのが、Ni-Alfa の方が若干、細胞毒性が強い傾向を示した。この要因として、二次粒子径が同程度であれば、一次粒子径が小さいほど一つの二次粒子を構成している一次粒子の数は多くなり、表面積も大きくなる。そのため、細胞内に取り込まれるナノマテリアルの一次粒子の数が多くなったり、細胞との接触面積や溶出する Ni イオン量が多くなったりし、結果として細胞毒性に違いが生じたものと考えられた。そのため、今後は培地への Ni イオン溶出量や細胞内の粒子濃度の測定などが必要と考えられた。

今年度の細胞毒性試験では、NiO-Sigma

及び Ni-Alfa について、各試験回における細胞毒性データのばらつきが大きく、それぞれの条件での詳細な比較はできなかった。細胞毒性試験のデータのばらつきが大きい要因としては、懸濁原液を 10 mg/mL で調製していた以前の研究の時よりも、粒子の分散状態が不安定であることが考えられる。そのため、今後、安定した分散方法の再検討も必要と思われる。

E. 謝辞

株式会社シンキーから湿式粉碎に用いた直径 0.05 mm のジルコニアボールを提供して頂きました。ここに謝意を表します。

F. 引用文献

- 1) Whatmore R.W.: Nanotechnology - what is it ? Should we be worried? Occup. Med., 56, 295-299, 2006
- 2) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials, Reprod. Toxicol., 30, 343-352, 2010
- 3) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, Environ. Health Perspect., 117, A158-A161, 2009
- 4) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, Anal. Bioanal. Chem., 398, 589-605, 2010
- 5) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, Anal. Bioanal. Chem., 396, 953-961, 2010
- 6) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会: ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/dl/h0331-17c.pdf>, 2009
- 7) European Commission: JRC SCIENCE

AND POLICY REPORTS “Interlaboratory comparison study of the colony forming efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials”, 2014

- 8) Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao Lede, Yu R., Zhao H., Lan M.: Study on controllable preparation of silica nanoparticles with multi-sizes and their size-dependent cytotoxicity in pheochromocytoma cells and human embryonic kidney cells, J. Health Sci., 56, 632-640, 2010
- 9) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J.: Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, Toxicology, 264, 110-118, 2009
- 10) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・小森谷薫・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H23-化学-一般-006)
- 11) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・小森谷薫・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H27-化学-一般-008)

G. 研究発表

G.1 論文発表

1. 松岡厚子・児玉幸夫・吉田緑・伊佐間和郎・中嶋富士雄・井上薫・河上強志・松田良枝・五十嵐良明: シリカ, 銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的評価, 国立衛研報, 2016, 134, 33-41.

G.2 学会発表

1. 宮島敦子・河上強志・小森谷薫・加藤玲子・新見伸吾・伊佐間和郎: 二次粒子

径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の応答, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 名古屋市, 2016 年 6 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

なし

表1. 実験に用いたナノマテリアルの製造(販売)先、一次粒子径および外観(色)

試料	略名	製造(販売)先	一次粒子径 ^a (nm)	外観(色) ^a
酸化ニッケル	NiO-Sigma	Sigma-Aldrich	< 50	黒色
ニッケル	Ni-Alfa	Alfa Aesar	5-20	シルバークレー

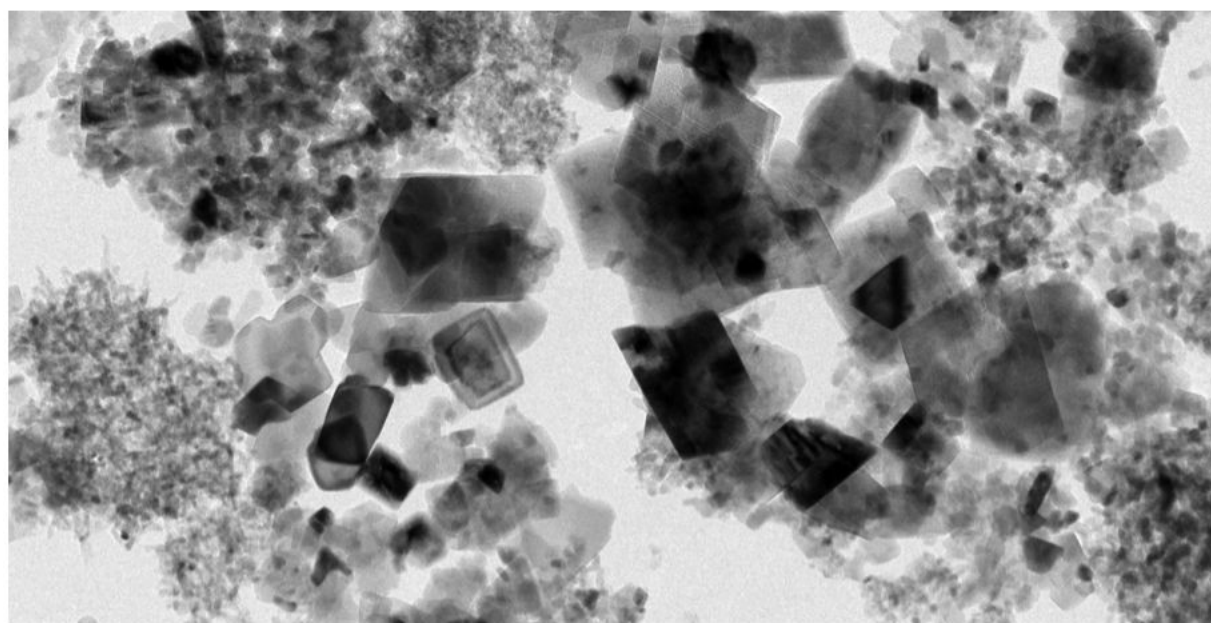
^a 各メーカーカタログより(エアロダイナミックパーティクルサイザー(APS)によるデータ)

表2. ナノマテリアル懸濁液中の平均粒子径(流体力学径)およびZeta電位¹⁾

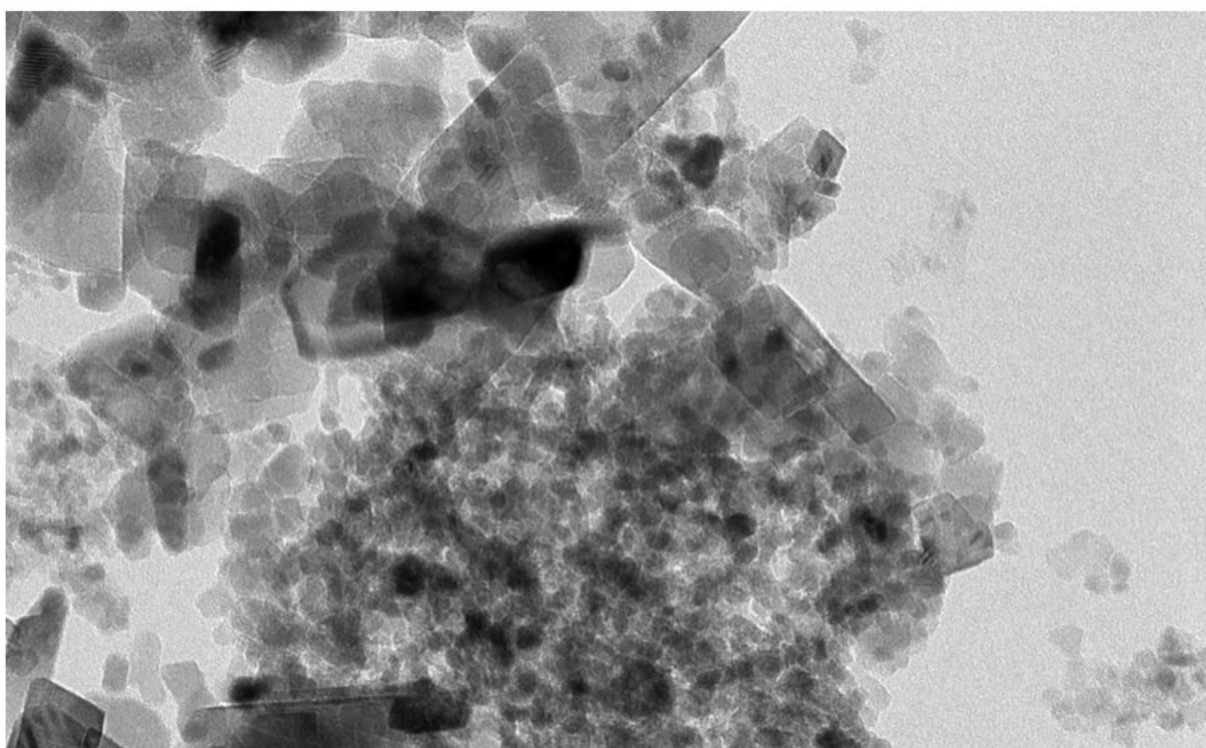
ナノマテリアル ^b	平均粒子径 (nm)		Zeta電位 (mV)		
	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	
NiO-Sigma	(0.05 mm)	149.9 ± 3.2	249.1 ± 9.1	19.8 ± 0.1	-11.7 ± 0.6
	1day ^a		229.2 ± 19.6		
	(0.1 mm)	216.7 ± 8.7	266.1 ± 4.5	24.8 ± 0.4	-10.7 ± 0.2
	1day		323.7 ± 13.3		
	(0.5 mm)	329.2 ± 5.8	405.6 ± 22.0	19.4 ± 0.5	-9.7 ± 0.7
	1day		424.3 ± 57.7		
Ni-Alfa	(0.05 mm)	192.4 ± 6.4	246.9 ± 22.0	22.8 ± 0.6	-8.4 ± 0.4
	1day		176.7 ± 2.2		
	(0.1 mm)	280.0 ± 4.7	361.2 ± 33.5	23.6 ± 0.7	-13.8 ± 0.4
	1day		262.3 ± 15.5		
	(0.5 mm)	357.7 ± 17.2	436.2 ± 89.4	22.1 ± 1.4	-10.8 ± 0.2
	1day		313.8 ± 16.7		

^a 1day: 37 °C で一日放置後

^b カッコ内は粉碎に用いたジルコニウムボールの粒子径



50nm



20 nm

図 1. NiO-Sigma の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

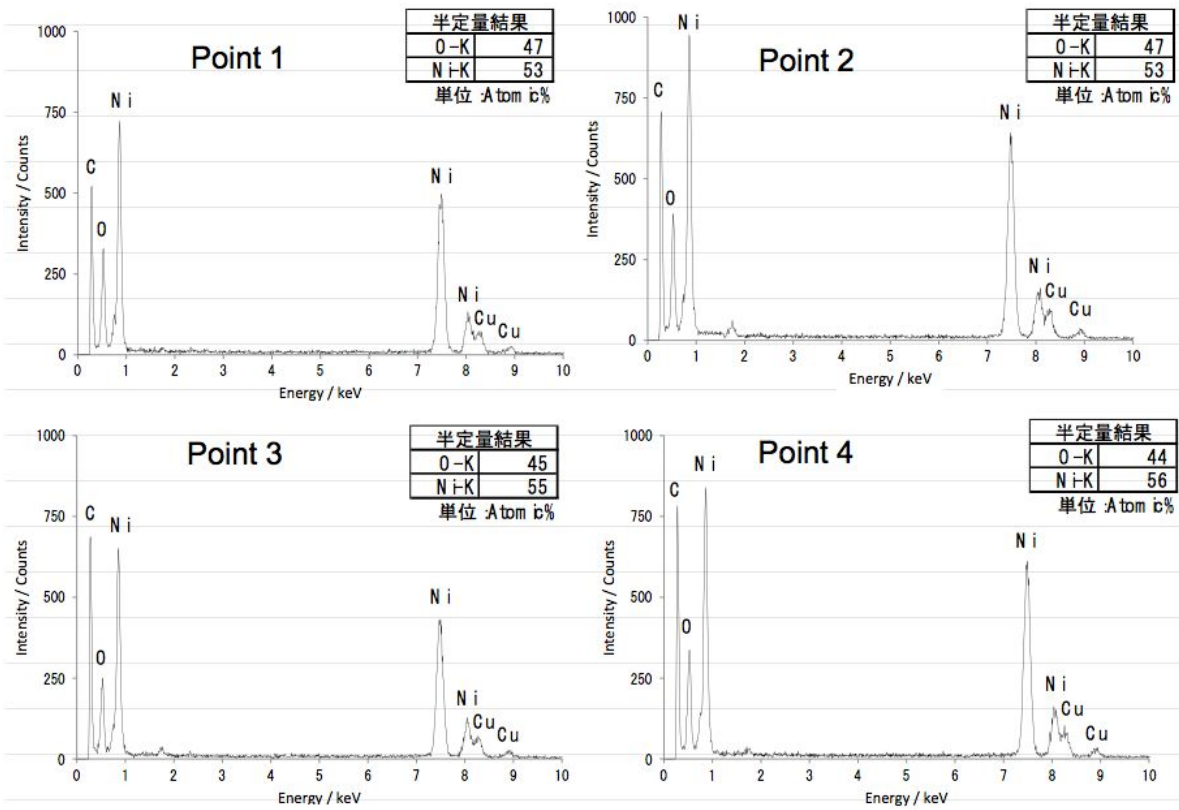
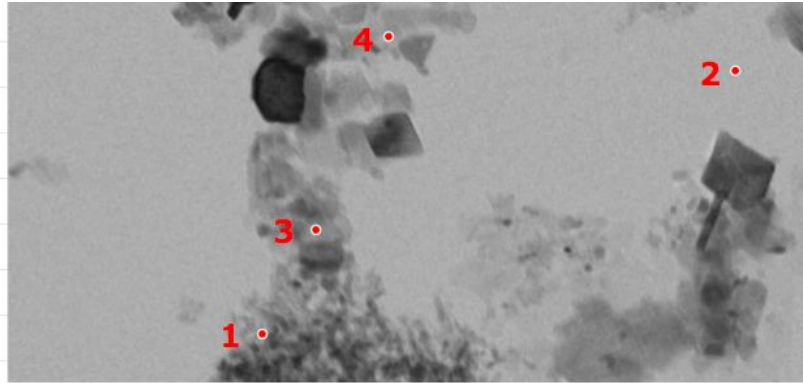


図 2. NiO-Sigma の大きさの異なる二次粒子の STEM-EDX 分析結果
(Cu は試料ホルダー起因のバックグラウンド)

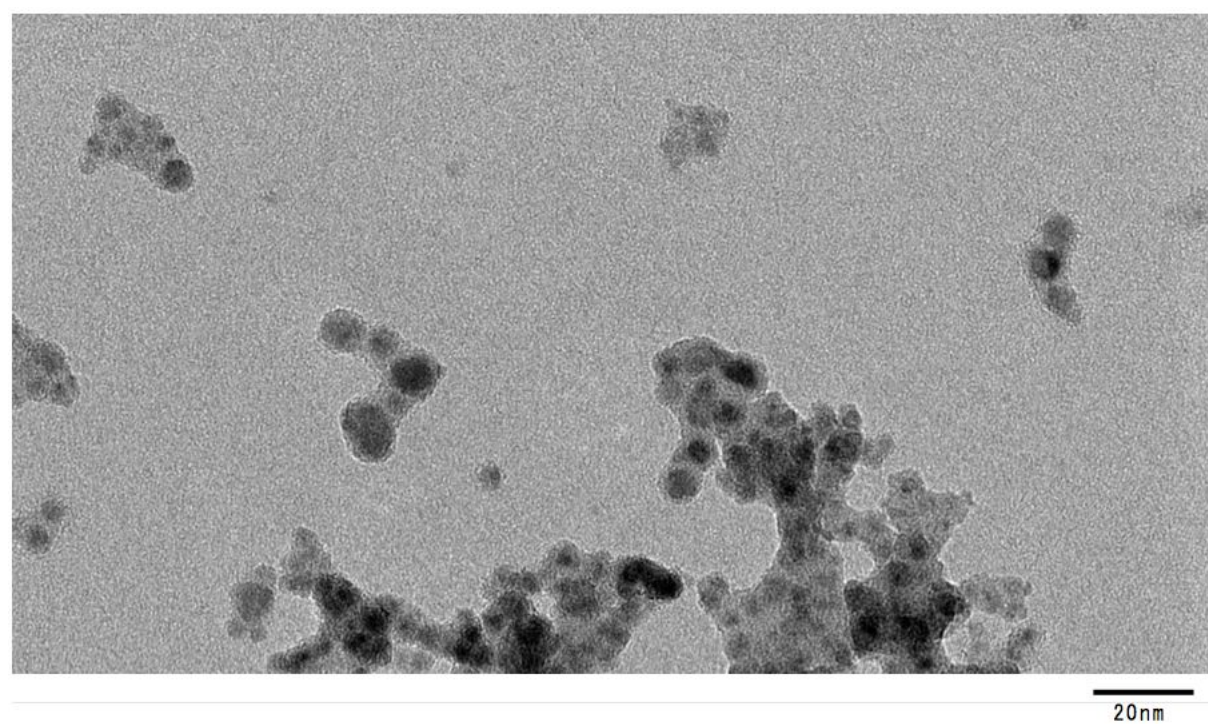
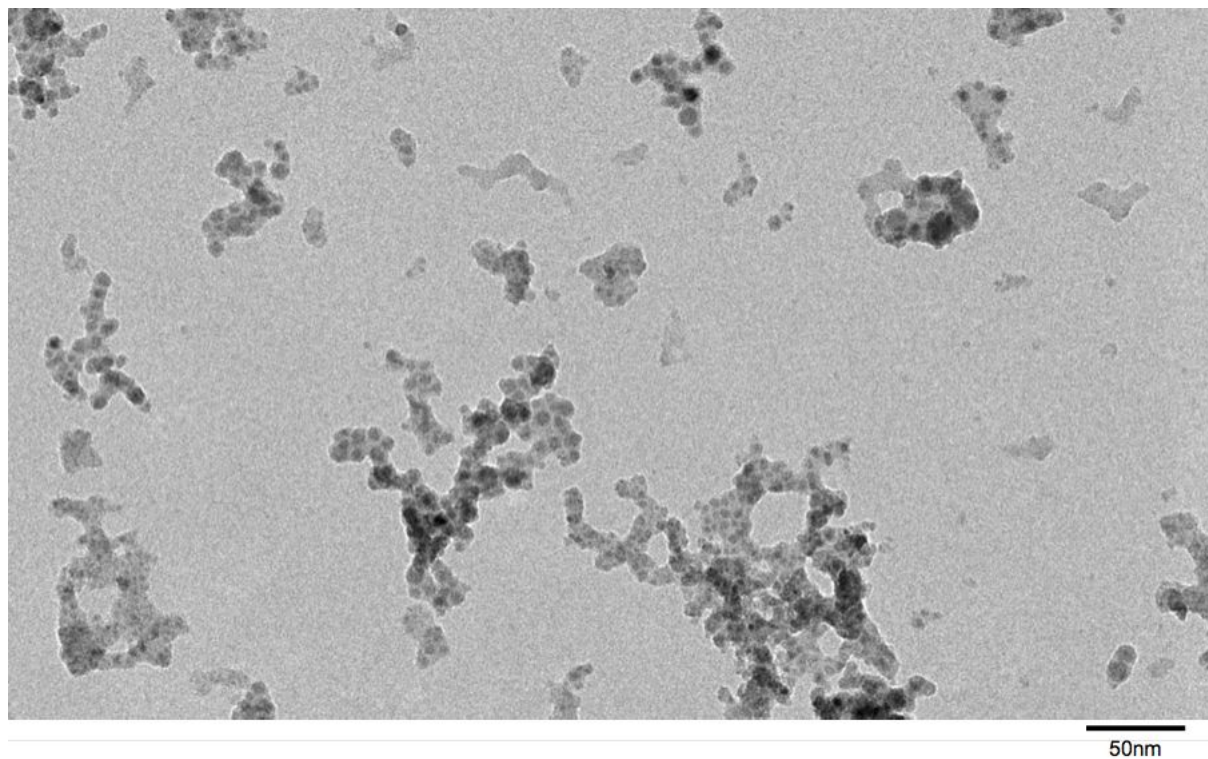


図 3. Ni-Alfa の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

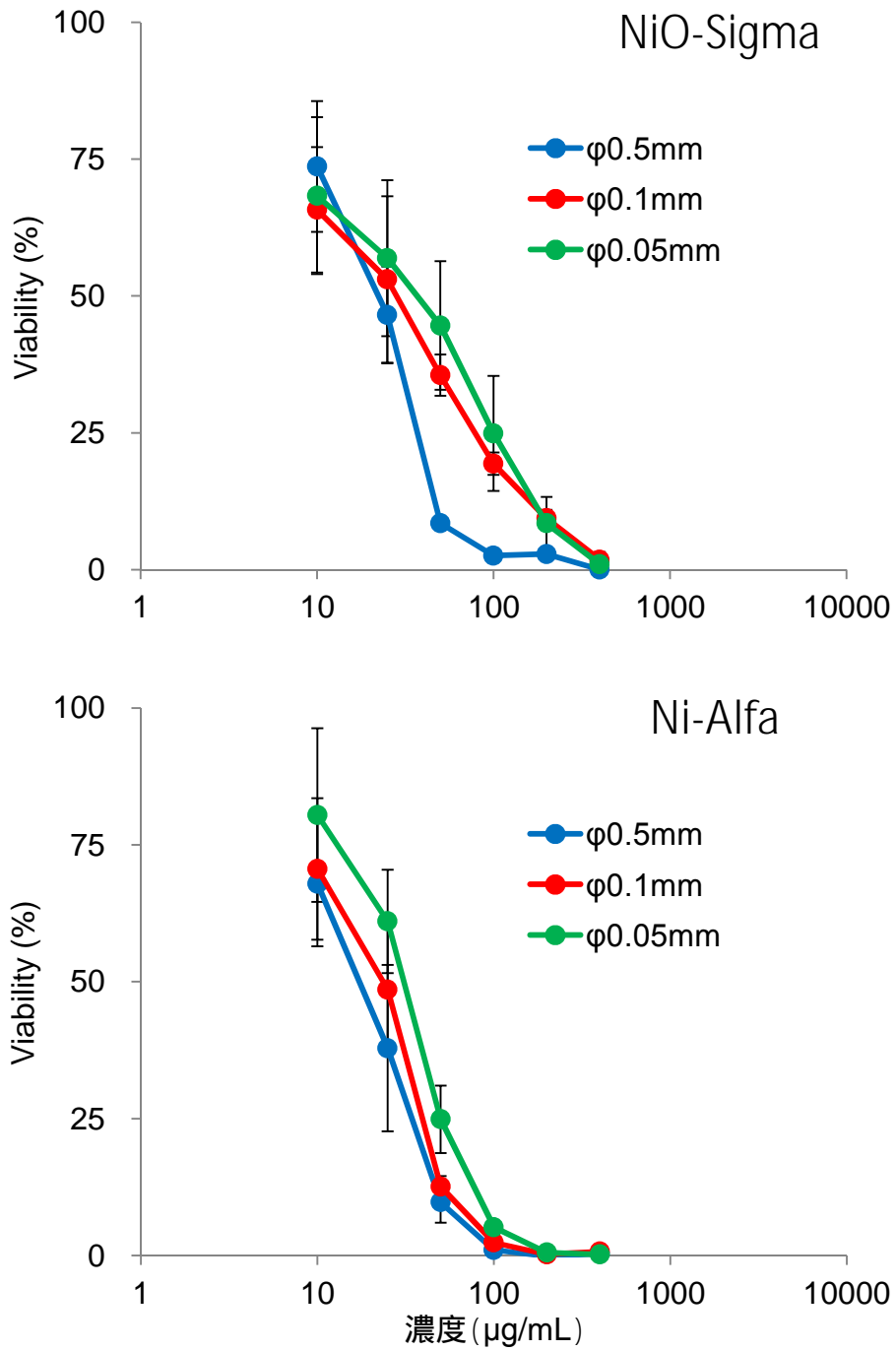


図4. 径の異なるジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

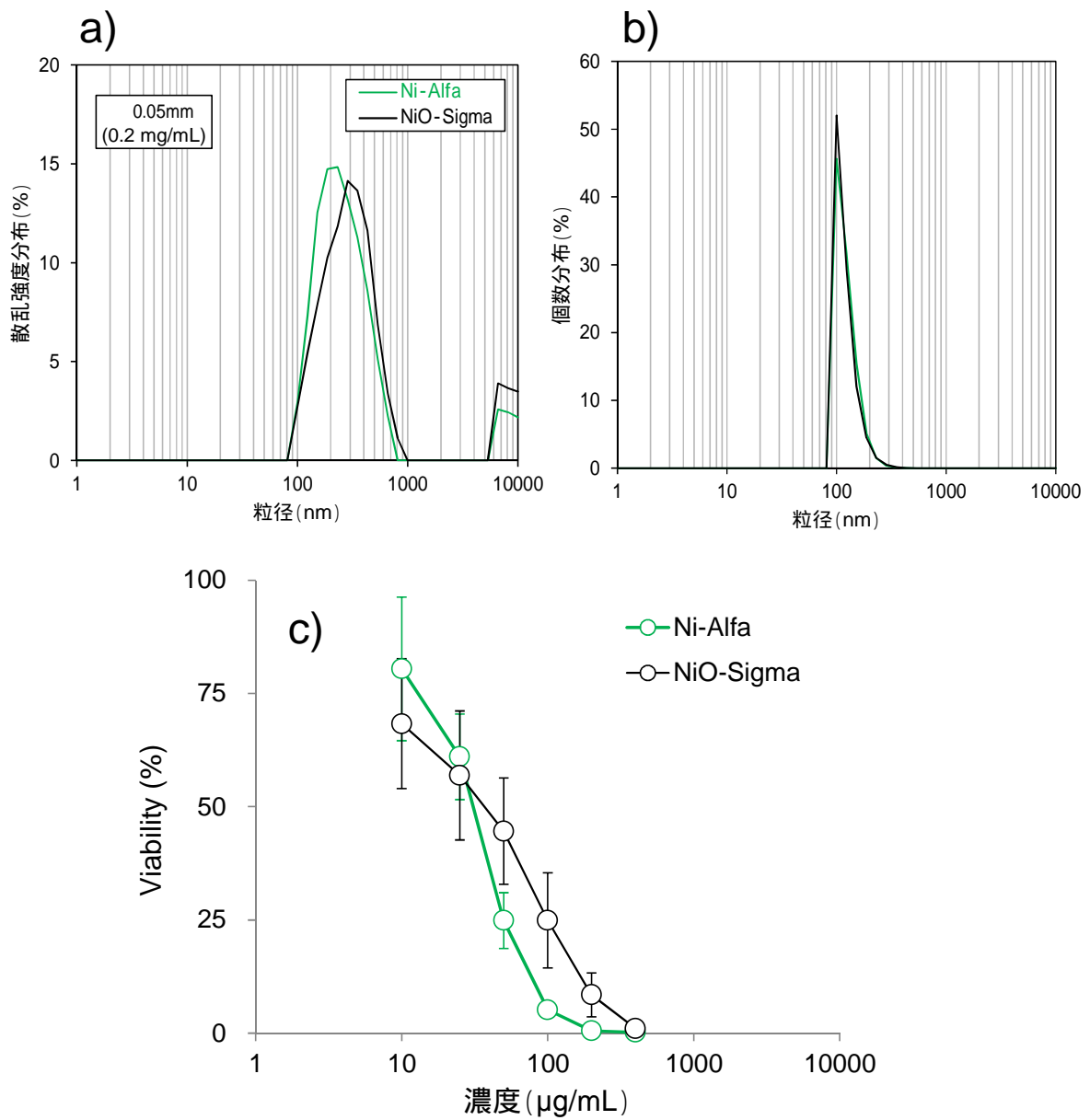


図 5. 径 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の粒子径分布 (a: 散乱強度分布、b:個数分布)¹¹⁾及び細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)